

ЛИЗОЦИМНАЯ АКТИВНОСТЬ СЛЕЗЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ С ДАКРИОЦИСТИТОМ НОВОРОЖДЕННЫХ

УДК 617.764.6–002–053.31–07

Поступила 04.07.2011 г.



Г.З. Галеева, врач-офтальмолог¹;

А.Н. Самойлов, д.м.н., доцент, зав. кафедрой офтальмологии²;

Л.Т. Мусина, д.м.н., профессор кафедры микробиологии²

¹Детская республиканская клиническая больница, Казань, Республика Татарстан, 420138, Оренбургский тракт, 140;

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Республика Татарстан, 420012, ул. Бултерова, 49

Цель исследования — определение лизоцимной активности слезы у детей раннего возраста с различными формами дакриоцистита новорожденных с помощью разработанной методики.

Материалы и методы. Лизоцимная активность слезы определялась по разработанной авторами методике. В исследовании принимали участие три группы детей: 1-я (20 детей, 40 глаз) — без гнойно-воспалительных заболеваний, в возрасте 1 мес — 1 год 1 мес; 2-я (57 детей, 69 глаз) — с катаральной формой дакриоцистита новорожденных, в возрасте 1 мес — 1 год 2 мес и 3-я (139 детей, 177 глаз) — с гнойной формой дакриоцистита, в возрасте 1 мес — 1 год 1 мес.

Заключение. Исследование лизоцимной активности слезы может служить надежным способом диагностики, прогнозирования исхода и контроля эффективности лечения воспалительных заболеваний глаз. Разработанная методика делает этот способ легким и надежным.

Ключевые слова: лизоцим, дакриоцистит новорожденного, лизоцимная активность слезы.

English

Lysozyme lacrimal activity as the immunity measure in children with dacryocystitis of newborns

G.Z. Galeeva, Ophthalmologist¹;

A.N. Samoilov, D.Med.Sc., Associate Professor, Head of the Department of Ophthalmology²;

L.T. Musina, D.Med.Sc., Professor, the Department of Microbiology²

¹Children Republic Clinical Hospital, Orenburgsky tract, 140, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation, 420138;

²Kazan State Medical University, Butlerov St., 49, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation, 420012

The aim of the investigation is to determine lysozyme lacrimal activity in children of early age with various forms of dacryocystitis of newborns using the technique developed.

Material and Methods. Lysozyme lacrimal activity was determined by the technique developed by the authors. Three groups of children were included into the study: the 1st group (20 children, 40 eyes) aged from 1 month to 1 year and a month — without pyoinflammatory diseases; the 2nd group (57 children, 69 eyes) aged from a month to a year and 2 months — with catarrhal form of dacryocystitis of newborns; and the 3rd group (139 children, 177 eyes) aged from 1 month to 1 year and a month — with purulent dacryocystitis.

Conclusion. The study of lysozyme lacrimal activity can serve as a safe method of diagnostics, prognosis of outcome and control of the treatment effectiveness of eye inflammatory diseases. The technique developed makes the method easy and safe.

Key words: lysozyme, dacryocystitis of newborns, lysozyme lacrimal activity.

Лизоцим — наиболее распространенный и часто изучаемый параметр при исследовании иммунологического статуса. Он относится к естественным защитным факторам организма и играет большую роль в борьбе против инвазивности многих микробов в полости рта, в верхних дыхательных путях и на слизистых оболочках глаза. Лизоцим является гликолитическим ферментом,

расщепляющим полисахаридные комплексы наружных мембран бактериальных клеток [1]. Его уровень при различных воспалительных заболеваниях колеблется в довольно широком диапазоне [2].

Известные в настоящее время способы определения содержания лизоцима основаны на его способности лизировать клеточную стенку *Micrococcus lysodeceticus*

Для контактов: Галеева Гузель Закировна, тел. моб. +7 937-288-06-18; e-mail: guzel@list.ru

путем расщепления β -(1,4)-гликозидной связи между мураминовой кислотой и глюкозаминном [3]. Широкое распространение получили два метода: диффузии в агар [4, 5] и турбодиметрическое определение активности лизоцима [2, 3, 6–8]. В основном лизоцим определяется в сыворотке крови и в слюне, так как эти биологические жидкости легко доступны для забора [3, 6, 8].

Сложность определения лизоцима в слезной жидкости обусловлена некоторыми трудностями забора слезы. В основном это осуществляется предварительным раздражением носа парами нашатырного спирта и забором слезы в количестве 0,1 мл [1]. Однако данный способ невозможно применить к детям раннего возраста. Оптимальных методик определения активности лизоцима, подходящих для детей раннего возраста, в доступной литературе не встречено.

Цель исследования — определение лизоцимной активности слезы у детей раннего возраста с различными формами дакриоцистита новорожденных с помощью разработанной методики.

Материалы и методы. Работа проводилась с 2008 по 2011 г. на базе офтальмологического отделения, отделения патологии новорожденных и микробиологической лаборатории Детской республиканской клинической больницы МЗ Республики Татарстан.

В исследование включены три группы детей. 1-я группа — 20 детей (40 глаз) без гнойно-воспалительных заболеваний, в том числе глаз, в возрасте от 1 мес до 1 года 1 мес; группа набиралась из детей, обратившихся на профилактический осмотр к офтальмологу в поликлинику ДРКБ. 2-я группа — 57 детей (69 глаз) с катаральной формой дакриоцистита новорожденных (ДН) в возрасте от 1 мес до 1 года 2 мес, из них мальчиков — 32, девочек — 25. Односторонний процесс отмечался у 45 детей, двусторонний — у 12. 3-я группа — 139 детей (177 глаз) с гнойной формой ДН в возрасте от 1 мес до 1 года 1 мес, из них мальчиков — 64, девочек — 75. Односторонний процесс отмечался у 101 ребенка, двусторонний — у 38 детей.

Всем детям проводились сбор анамнеза, клиническое обследование, микробиологическое обследование с определением возбудителя ДН, заполнялась статистическая карта. Перед исследованием все местное лечение отменялось на 2–3 дня.

Микробиологическое обследование выполнялось по общепринятой методике.

Лизоцимная активность слезы определялась по оригинальной разработанной нами методике (заяв-

ка на патент №019550 от 05.04.2010). Из 24-часовой агаровой культуры *Micrococcus lysodecticus* (штамм №2665, полученный из ГИСК им. Тарасевича) по оптическому стандарту мутности (0,5 по Макфарланду) готовят суспензию тест-культуры в физиологическом растворе. На поверхность питательного шоколадного агара равномерно рассеивают эту суспензию с формированием микробного газона. Забор слезы осуществляют стерильными дисками из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм путем погружения диска в нижний свод конъюнктивы. Пропитанные слезой диски укладывают на поверхность приготовленного микробного газона, который инкубируют в термостате 24 ч. Далее производят учет результатов по диаметру зоны задержки роста культуры. Лизоцимная активность слезы определена в группе здоровых детей — на обоих глазах, у детей с ДН — на всех больных и непораженных глазах.

Статистическая обработка заключалась в вычислении средних значений и процентных доверительных интервалов для средних значений, для сравнения данных использован критерий сопряженности хи-квадрат и двухвыборочный критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Диаметр зоны задержки роста *M. lysodecticus* у здоровых детей составляет $27,708 \pm 0,012$ мм.

Лизоцимная активность слезы у детей с катаральным ДН имеет свои особенности (табл. 1).

Диаметр зоны задержки роста *M. lysodecticus* при оценке общей лизоцимной активности слезы на больном глазу составляет $23,530 \pm 0,126$ мм, на здоровом глазу — $23,160 \pm 0,013$ мм. Диаметр зоны ограничения роста микрококка на здоровом глазу меньше, чем на больном, что говорит о более выраженном снижении лизоцимной активности слезы на здоровом глазу по сравнению с больным при катаральном ДН. Данные, полученные в нашем эксперименте, оказались неожиданными, вопрос требует дальнейшего изучения, поскольку объяснений таким результатам в доступной литературе мы не нашли. При ДН, вызванном *S. epidermidis*, зона задержки роста культуры на обоих глазах практически соответствует средним в группе, в подгруппе *S. aureus* она выше, чем среднее значение в группе. *S. aureus* дает наименьшее снижение лизоцимной активности слезы при катаральном ДН.

Статистический анализ показал высокозначимое различие между диаметрами зон ограничения роста культуры в группе здоровых детей и средним значением в группе катарального ДН как на больном, так и на здоровом глазу. Во всех группах сравнения $p < 0,001$. Диаметр зоны задержки роста в группе здоровых детей статистически значимо больше, чем в группе катарального ДН.

При сравнении средних показателей в группе катарального ДН отмечено статистически значимое снижение диаметра зоны задержки роста на здоровом глазу по сравнению с больным ($p = 0,012$).

Лизоцимная активность слезы в группе гнойного ДН представлена в табл. 2.

Таблица 1

Лизоцимная активность слезы в группе катарального ДН ($M \pm m$)

Возбудители	Диаметр зоны ограничения роста, мм	
	на больном глазу	на здоровом глазу
Общая лизоцимная активность в группе (все возбудители)	$23,530 \pm 0,126$	$23,160 \pm 0,013$
<i>S. epidermidis</i>	$23,315 \pm 0,011$	$23,169 \pm 0,008$
<i>S. aureus</i>	$24,600 \pm 0,060$	$24,500 \pm 0,113$
Дрожжи	22,0	22,0

Таблица 2

Лизоцимная активность слезы в группе гнойного ДН (M±m)

Возбудители	Диаметр зоны ограничения роста, мм	
	на больном глазу	на здоровом глазу
Общая лизоцимная активность в группе (все возбудители)	22,263±0,006	22,274±0,010
<i>S. aureus</i>	22,958±0,014	23,5
<i>S. pneumoniae</i>	22,220±0,012	–
<i>S. epidermidis</i>	22,320±0,010	22,171±0,012
<i>E. faecium</i>	21,670±0,014	20,0
<i>P. aeruginosae</i>	22,330±0,013	22,5
<i>S. haemolyticus</i>	21,7	20,0
<i>Enterobacter</i>	21,800±0,015	23,0
<i>S. viridans</i>	22,0	–
<i>S. saprofiticus</i>	23,0	–
<i>H. saprofiticus</i> и <i>H. influenzae</i>	22,3	22,0
<i>C. albicans</i>	26,0	–
<i>Citrobacter</i>	22,0	21,5
<i>K. pneumoniae</i>	24,0	25,0
<i>S. maltophilia</i>	22,7	–

Таблица 3

Сравнение диаметров зон задержки роста *M. lysodecticus* в группе гнойного ДН на здоровом и больном глазу

Сравниваемые группы (здоровый глаз – больной глаз)	Критерий Стьюдента (t) и критический уровень значимости (p)	Диаметр (D)
Все возбудители	t=0,79; p=0,78	D (здор.)=D (бол.)
<i>S. epidermidis</i>	t=0,27; p=0,61	D (здор.)=D (бол.)

Таблица 4

Сравнение диаметров зон задержки роста *M. lysodecticus* в группе гнойного ДН при различных возбудителях

Сравниваемые группы	Критерий Стьюдента (t) и критический уровень значимости (p)	Диаметр (D)
<i>S. faecium</i> – <i>S. aureus</i>	t=2,4; p=0,012	D (<i>S. aur.</i>)>D (<i>S. faec.</i>) (различие значимо)
<i>Enterobacter</i> – <i>S. aureus</i>	t=2,15; p=0,022	D (<i>S. aur.</i>)>D (<i>Enterob.</i>) (различие значимо)
<i>P. aeruginosae</i> – <i>S. aureus</i>	t=1,1; p=0,14	D (<i>S. aur.</i>)=D (<i>P. aerug.</i>)
<i>S. epidermidis</i> – <i>S. aureus</i>	t=1,37; p=0,09	D (<i>S. aur.</i>)>D (<i>S. epiderm.</i>) (различие слабо значимо)
<i>S. pneumoniae</i> – <i>S. aureus</i>	t=1,42; p=0,08	D (<i>S. aur.</i>)>D (<i>S. pneum.</i>) (различие слабо значимо)
<i>S. epidermidis</i> – <i>S. pneumoniae</i>	t=0,22; p=0,42	D (<i>S. epiderm.</i>)=D (<i>S. pneum.</i>)
<i>S. faecium</i> – <i>S. pneumoniae</i>	t=1,05; p=0,15	D (<i>S. faec.</i>)=D (<i>S. pneum.</i>)
<i>Enterobacter</i> – <i>S. pneumoniae</i>	t=0,79; p=0,22	D (<i>Enterob.</i>)=D (<i>S. pneum.</i>)
<i>P. aeruginosae</i> – <i>S. pneumoniae</i>	t=0,2; p=0,58	D (<i>P. aerug.</i>)=D (<i>S. pneum.</i>)
<i>S. faecium</i> – <i>S. epidermidis</i>	t=1,36; p=0,094	D (<i>S. epiderm.</i>)>D (<i>S. faec.</i>) (различие слабо значимо)
<i>Enterobacter</i> – <i>S. epidermidis</i>	t=1,08; p=0,16	D (<i>Enterob.</i>)=D (<i>S. epiderm.</i>)
<i>P. aeruginosae</i> – <i>S. epidermidis</i>	t=0,02; p=0,49	D (<i>P. aerug.</i>)=D (<i>S. epiderm.</i>)
<i>Enterobacter</i> – <i>S. faecium</i>	t=0,24; p=0,41	D (<i>Enterob.</i>)=D (<i>S. faec.</i>)
<i>Enterobacter</i> – <i>P. aeruginosae</i>	t=0,92; p=0,19	D (<i>Enterob.</i>)=D (<i>P. aerug.</i>)
<i>S. faecium</i> – <i>P. aeruginosae</i>	t=1,16; p=0,13	D (<i>S. faec.</i>)=D (<i>P. aerug.</i>)

В группе гнойного ДН лизоцимная активность слезы на здоровом и на больном глазу ниже, чем в группе катарального ДН (см. табл. 2). Зона задержки роста *M. lysodecticus* составляет 22,263±0,006 мм — на больном и 22,274±0,010 — на здоровом глазу. Наибольшее снижение лизоцимной активности вызывают *E. faecium*, *S. haemolyticus*, *Enterobacter*; *S. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosae*, *S. viridans*, *H. saprofiticus* и *H. influenzae*, *Citrobacter*, *S. maltophilia* дают зоны задержки роста культуры, приблизительно равные средним значениям в группе на больном и здоровом глазу. Диаметр зон задержки роста больше среднего дают *S. aureus*, *S. saprofiticus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, из них наименьшее снижение лизоцимной активности слезы вызывают *C. albicans* и *K. pneumoniae*.

При сравнении диаметров зон задержки роста *M. lysodecticus* в группе здоровых детей и у различных возбудителей гнойного ДН во всех случаях выявлено высокосignificantное различие (p<0,001). Диаметр зон задержки роста культуры при всех возбудителях гнойного ДН меньше диаметра в группе здоровых детей как на больном, так и на здоровом глазу.

Сравнение диаметров зон задержки роста *M. lysodecticus* в группе гнойного ДН между здоровым и больным глазом с помощью критерия Стьюдента (табл. 3) говорит о статистически значимом снижении лизоцимной активности как на больном, так и на непораженном глазу.

По данным статистического анализа с помощью критерия Стьюдента выявлены различия между диаметрами зон ограничения роста культуры при ДН, вызванном различными возбудителями (табл. 4). Слабо значимое различие отмечено в следующих парах: *S. epidermidis*–*S. aureus*, *S. pneumoniae*–*S. aureus*, *S. faecium*–*S. epi-*

Таблица 5

Сравнение лизоцимной активности слезы в группах катарального и гнойного ДН (M±m)

Возбудители	Диаметр зоны ограничения роста, мм			
	Катаральный ДН		Гнойный ДН	
	на больном глазу	на здоровом глазу	на больном глазу	на здоровом глазу
Общая лизоцимная активность в группе (все возбудители)	23,530±0,013	23,160±0,013	22,563±0,006	22,274±0,010
<i>S. epidermidis</i>	23,315±0,011	23,169±0,008	22,320±0,010	22,171±0,012
<i>S. aureus</i>	24,6	24,5	22,958±0,014	23,5

S. epidermidis. Значимое различие установлено при сравнении *S. faecium*–*S. aureus*, *Enterobacter*–*S. aureus*. При сравнении остальных пар различий не выявлено. Таким образом, различные возбудители по-разному снижают лизоцимную активность слезы в пределах одной клинической формы ДН.

Анализ лизоцимной активности слезы в группах катарального и гнойного ДН (табл. 5) показал, что в группе гнойного ДН она статистически значимо ниже, чем в группе катарального ДН. При сравнении по отдельным возбудителям сохраняется та же тенденция. Сравнение производилось по тем группам, в которых имеется больше 7 наблюдений.

Заключение. Лизоцимная активность слезы у детей с дакриоциститом новорожденных снижена как на больном, так и на здоровом глазу по сравнению с группой здоровых детей.

В группе с гнойным дакриоциститом она ниже, чем в группе с катаральной формой. Разные возбудители по-разному снижают лизоцимную активность слезы. Следовательно, исследование лизоцимной активности слезы может служить надежным способом диагностики, прогнозирования исхода и контроля эффективности лечения воспалительных заболеваний глаз. Разработанная методика делает этот способ легким и надежным.

Литература

1. Бердиев Н.Б., Адамчук Л.В., Рахимова О.Я. Определение активности лизоцима в слюне. *Здравоохранение Таджикистана* 1986; 3: 102.
2. Блумберг И.А., Дундуре Б.Л. Фотометрический метод определения лизоцима в интраназальной жидкости. *Лаб дело* 1987; 7: 617–618.
3. Валиева Г.Н., Шевчук Н.А., Бабушкин А.Э. О возможности иммунологического прогнозирования исхода дакриоциститомии. В кн.: *Офтальмоиммунология. Итоги и перспективы*. Материалы научн.-практ. конф. М; 2007; с. 48–50.

4. Горскова Е.Н., Севостьянов Е.Н., Теплова С.Н. Способ диагностики кератоконуса. А.с. РФ 2115735. 1998.
5. Дорофейчук В.Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом. *Лаб дело* 1968; 1: 28–30.
6. Кисель С.С. Улучшенная турбидиметрическая методика определения активности лизоцима. *Здравоохранение Белоруссии* 1972; 5: 36–38.
7. Ковалевская М.А. Разработка методов экспресс-диагностики и оценки динамики терапии при некоторых инфекционных заболеваниях глаз. Дис. ... докт. мед. наук. Воронеж; 2006.
8. Колединцев М.Н. Клинико-экспериментальная разработка системы скринингового анализа слезной жидкости для диагностики, прогноза и контроля эффективности проводимого лечения при различных формах патологии глаз. Дис. ... докт. мед. наук. М; 2005.

References

1. Berdiev N.B., Adamchuk L.V., Rakhimova O.Ya. *Zdravookhranenie Tadzhikistana* 1986; 3: 102.
2. Blumberg I.A., Dundure B.L. *Laboratornoe delo* 1987; 7: 617–618.
3. Valieva G.N., Shevchuk N.A., Babushkin A.E. *Oftal'moimmunologiya. Itogi i perspektivy. Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Materials of scientific and practical conference "Ophthalmology. Results and prospects"]. Moscow; 2007; p. 48–50.
4. Gorskova E.N., Sevost'yanov E.N., Teplova S.N. *Sposob diagnostiki keratokonusa* [Method of diagnosing keratoconus]. A.s. RF 2115735. 1998.
5. Dorofeychuk V.G. *Laboratornoe delo* 1968; 1: 28–30.
6. Kisel' S.S. *Zdravookhranenie Belorussii* 1972; 5: 36–38.
7. Kovalevskaya M.A. *Razrabotka metodov ekspress-diagnostiki i otsenki dinamiki terapii pri nekotorykh infektsionnykh zabolevaniyakh glaz*. Dis. ... dokt. med. nauk [The development of the techniques of express-diagnostics and assessment of therapy dynamics in some eye infectious diseases. Abstract of Dissertation for the degree of Doctor of Medical Science]. Voronezh; 2006.
8. Koledintsev M.N. *Kliniko-eksperimental'naya razrabotka sistemy skrininrovogo analiza slезnoy zhidkosti dlya diagnostiki, prognoza i kontrolya effektivnosti provodimogo lecheniya pri razlichnykh formakh patologii glaz*. Dis. ... dokt. med. nauk [Clinical and experimental development of screening analysis system of lacrimal fluid for diagnostics, prognosis and therapy efficiency control in various eye pathologies. Abstract of Dissertation for the degree of Doctor of Medical Science]. Moscow; 2005.